

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Oktober 2006 (12.10.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/105563 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12P 1/02 (2006.01) *C12P 1/04* (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2006/000129

(22) Internationales Anmeldedatum:

31. März 2006 (31.03.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

A 574/2005 5. April 2005 (05.04.2005) AT

(71) Anmelder und

(72) Erfinder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): ERBER AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; In-
dustriestrasse 21, A-3130 Herzogenburg (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FREUDENSCHUSS,

Martin [AT/AT]; Kirlstrasse 3/37/2, A-3370 Ybbs (AT).
HÄUBL, Georg [AT/AT]; Siebenbrunnenfeldgasse 4/26,
A-1050 Wien (AT). KRSKA, Rudolf [AT/AT]; Lorenz-
Böhler-Gasse 6, A-3430 Tulln (AT). JAUNECKER, Gün-
ther [AT/AT]; Fuchsgasse 1-7/4/4, A-3430 Tulln (AT).
BINDER, Eva [AT/AT]; A-7501 Unterwart 269, A-1190
Wien (AT).

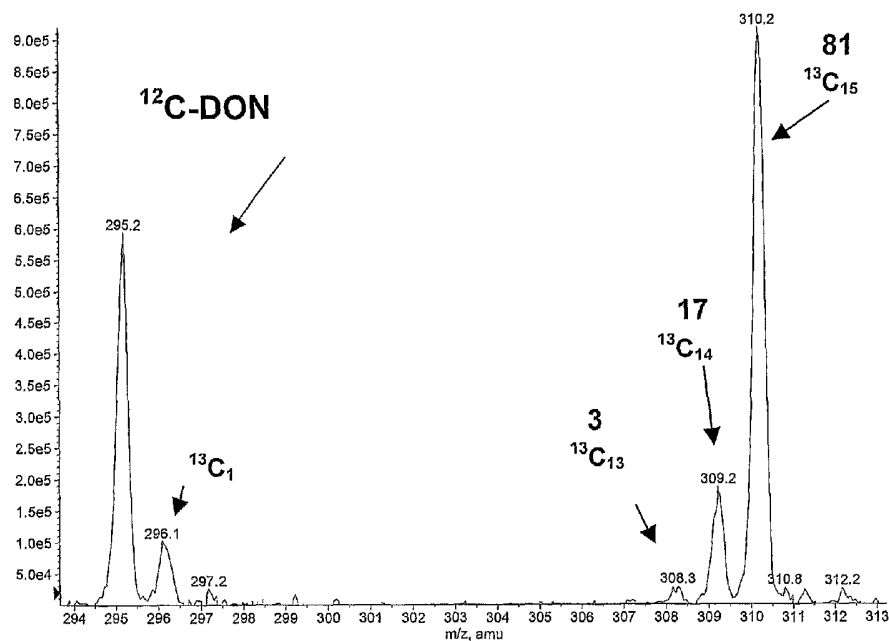
(74) Anwalt: CUNOW, Gerda; Miksovsky & Pollhammer
OEG, Währingerstrasse 3, A-1096 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: PRODUCTION OF HIGHLY ISOTOPICALLY LABELLED, SECONDARY, MICROBIAL METABOLIC PROD-
UCTS, AND CORRESPONDING METABOLIC PRODUCTS

(54) Bezeichnung: HERSTELLUNG VON HOCHGRADIG ISOTOPENMARKIERTEN, SEKUNDÄREN, MIKROBIELLEN
STOFFWECHSELPRODUKTEN SOWIE STOFFWECHSELPRODUKTE



(57) Abstract: The invention relates to a method for producing isotopically labelled secondary metabolic products of fungi or bacteria in a liquid synthetic culture medium. According to said method, the synthesis is carried out by immobilising the fungi or bacteria on an inert carrier, adding a liquid synthetic culture medium in which essentially all of the carbon atoms, nitrogen atoms and/or sulphur atoms are replaced by stable isotopes.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- (84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) **Zusammenfassung:** Bei einem Verfahren zur Herstellung von isotoopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukten von Pilzen oder Bakterien in einem flüssigen, synthetischen Kulturmedium, wird die Synthese durch Immobilisieren der Pilze oder Bakterien auf einem inerten Träger unter Zugabe von flüssigem, synthetischem Kulturmedium, in welchem im wesentlichen sämtliche Kohlenstoffatome, Stickstoffatome und/oder Schwefelatome durch stabile Isotope ersetzt wurden, durchgeführt.

HERSTELLUNG VON HOCHGRADIG ISOTOPENMARKIERTEN, SEKUNDÄREN,
MIKROBIEELLEN STOFFWECHSELPRODUKTEN SOWIE
STOFFWECHSELPRODUKTE

5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von isotopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukten von Pilzen oder Bakterien in einem flüssigen, synthetischen Kulturmedium sowie auf isotopenmarkierte, sekundäre Stoffwechselprodukte von Pilzen oder Bak-
10 terien.

Isotopenmarkierte Substanzen gewinnen in der heutigen Zeit immer größere Bedeutung, insbesondere in der Technologie der Flüssigkeitschromatografie mit massenspektrometrischer
15 Detektion (LCMS), in welcher eine effiziente, spektrometrische Analyse mit hohem Produktdurchsatz ermöglicht wird. Die Technologie kann für eine große Vielfalt von potentiellen Analyten eingesetzt werden, wobei es keine Begrenzung der Molekülmasse gibt, jedoch Probleme bei dem Nachweis der
20 einzelnen Substanzen dahingehend auftreten können, daß sowohl die Zerfallsspektren als auch die einzelnen Molekülpeaks entsprechend zugeordnet werden müssen. Um hierbei eine verlässliche LCMS-Applikation und -Methoden zu erzielen, ist die Verwendung von sogenannten internen Standardsubstanzen
25 von steigender Bedeutung. Interne Standards sind Substanzen, die eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem eigentlichen Zielanalyten aufweisen, d.h. insbesondere wenn möglich eine idente molekulare Struktur aufweisen, jedoch mit unterschiedlichem Molekulargewicht. Als ideale interne Standards
30 erweisen sich daher isotopenmarkierte Moleküle des Zielanalyten, d.h. Moleküle, in welchen ein oder mehrere Atome im Molekül durch ihre Isotopen ersetzt werden. Gegenwärtig werden derartige Substanzen durch organische Synthese her-

gestellt, indem beispielsweise Wasserstoffe oder Kohlenstoffe durch die entsprechenden schwereren Isotopen ersetzt werden.

- 5 In diesem Zusammenhang hat es sich jedoch bei LCMS-Analysen gezeigt, daß es wünschenswert ist, daß die isotopenmarkierten Substanzen, die als interne Standards verwendet werden, einen Molekülmassenunterschied von wenigstens 3 besitzen, um eine deutliche Trennung von dem Zielanalyten erzielen zu können und daß, wenn möglich Substanzen zum Einsatz gelangen sollen, die aus so wenigen Isotopomeren wie möglich bestehen.

Ein Weg, isotopenmarkierte, pflanzliche oder mikrobielle Metaboliten herzustellen, ist über den Biosyntheseweg der entsprechenden Pflanzen und/oder Mikroben. Hierbei werden die Kulturmedien mit radioaktiv markierten Nährstoffen versetzt und die Nährmediumsbestandteile werden zu einem gewissen Prozentsatz in die anabolischen und metabolischen Kreisläufe der Mikroben- oder Pflanzenkulturen eingebaut, so daß Isotope in die Stoffwechselprodukte inkorporiert werden. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist es, daß mit diesem Verfahren lediglich eine unvollständige Markierung erzielbar ist und normalerweise ein Gemisch von verschiedensten Isotopomeren gebildet wird, wodurch die Verwendung von derartigen isotopenmarkierten Substanzen bzw. isotopenmarkierten, pflanzlichen oder mikrobiellen Metaboliten zur Verwendung als interne Standards nur schlecht geeignet scheint, da bei Einsatz derartiger Substanzen nicht ein Standard zur Anwendung käme, sondern eine breite Palette von Isotopomeren, wodurch wiederum ein gezielter Nachweis von Zielsubstanzen in LCMS-Spektrometrien nicht bzw. nur äußerst schwer möglich erscheint.

Die vorliegende Erfindung zielt nun darauf ab, ein Verfahren zur Herstellung von isotoopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukten von Pilzen oder Bakterien zur Verfügung zu stellen, in welchen sämtliche bzw. nahezu sämtliche Kohlenstoffatome, Stickstoffatome oder Schwefelatome in dem Ausgangsprodukt durch stabile Isotopen ersetzt werden und dadurch ein einziges, isotoopenmarkiertes Endprodukt erzielt wird, welches in spektrometrischen Verfahren, insbesondere LCMS, leicht und sicher nachweisbar ist. Die Erfindung zielt weiters auf die Herstellung eines Stoffwechselprodukts ab, welches als interner Standard bzw. in spektrometrischen Analyseverfahren, insbesondere LCMS, sicher und zuverlässig eingesetzt bzw. verwendet werden kann.

15

Zur Lösung dieser Aufgaben wird das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung so geführt, daß die Synthese durch Immobilisieren der Pilze oder Bakterien auf einem inerten Träger unter Zugabe von flüssigem, synthetischem Kulturmedium, in welchem im wesentlichen sämtliche Kohlenstoffatome, Stickstoffatome und/oder Schwefelatome durch stabile Isotope ersetzt wurden, durchgeführt wird. Dadurch, daß die Synthese durch Immobilisieren der Pilze oder Bakterien auf einem inerten Träger unter Zugabe von flüssigem, synthetischem Kulturmedium, in welchem im wesentlichen sämtliche Kohlenstoffatome, Stickstoffatome und/oder Schwefelatome durch stabile Isotope ersetzt wurden, durchgeführt wird, gelingt es, ein isotoopenmarkiertes Stoffwechselprodukt der Pilze und Bakterien herzustellen, in welchem sämtliche Atome bzw. wenigstens 95 % der Atome, die durch Anzucht aus dem Kulturmedium entnommen werden können, nämlich Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatome, durch die stabilen Isotopen der im Kulturmedium ent-

haltenen, isotoopenmarkierten Nährsubstanzen ersetzt sind und somit ein gezieltes, isotoopenmarkiertes Produkt erhalten werden kann und nicht, wie dies im Stand der Technik vielfach beschrieben wurde, eine Mischung von verschiedenen
5 Homologen mit variierender Anzahl von Isotoopenatomen erzielbar ist. Durch dieses Herstellungsverfahren kann somit ein isotoopenmarkiertes, sekundäres Stoffwechselprodukt erzielt werden, welches gezielt einsetzbar ist und welches in sämtlichen Analysen bzw. auch in metabolischen Studien klar
10 und eindeutig nachgewiesen werden kann.

Gemäß einer Weiterbildung ist das Verfahren so geführt, daß als Kohlenstoffquelle im flüssigen, synthetischen Kulturmedium Zucker oder Zuckeralkohole, insbesondere D-[U-¹³C₆]-
15 Glucose, ¹³C-Saccharose, ¹³C-Glycerin und/oder ¹³C-Acetat, als Stickstoffquellen ¹⁵N-Aminosäuren, -Nitrate, -Ammoniumverbindungen oder -Harnstoff, als Schwefelquellen ³³S- oder ³⁴S-Sulfate, -Sulfide oder -Aminosäuren eingesetzt sind. Indem vollständig durchmarkierte Kohlenstoff-, Stickstoff- und/oder Schwefelquellen in dem flüssigen, synthetischen Kulturmedium enthalten sind, ist bei der Anzucht von Stoffwechselprodukten von Pilzen oder Bakterien der Pilz bzw. das Bakterium gezwungen, in das Stoffwechselprodukt das jeweilige markierte Isotop einzubauen, so daß sichergestellt werden kann, daß die sekundären Stoffwechselprodukte der Pilze oder Bakterien zu einem hohen Grad, wenn nicht vollständig mit den entsprechenden Isotopen markiert bzw. durch die entsprechenden Isotopen ersetzt sind.

30 Zur Verbesserung der Ausbeute an isotoopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukten von Pilzen oder Bakterien wird das Verfahren gemäß einer Weiterbildung so geführt, daß das flüssige, synthetische Kulturmedium zusätzlich eine Mi-

schung, gewählt aus anorganischen Salzen oder Säuren und Basen mit den Ionen Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} , Zn^{++} , Cu^{++} , B^{+++} sowie CO_3^{--} , SO_4^{--} , PO_4^{---} , NO_3^- , enthält. Indem in dem flüssigen, synthetischen Kulturmedium Salze oder Säuren und
5 Basen mit den Ionen Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Fe^{+++} , Zn^{++} , Cu^{++} , B^{+++} sowie CO_3^{--} , SO_4^{--} , PO_4^{---} , NO_3^- enthalten sind, wird sichergestellt, daß sämtliche Fremdionen, welche möglicherweise in den Pilzen oder Bakterien neben Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel enthalten sind, in ausreichender
10 Menge und sicher zur Verfügung gestellt werden, wodurch neben rascher Anzucht auch eine hohe Ausbeute erzielbar ist.

Zur weiteren Verbesserung der Ausbeute wird als inerter Träger ein natürlicher oder synthetischer Träger mit großer
15 innerer Oberfläche, insbesondere Silikat, Schichtsilikat, Zeolith, Bentonit, gebrannter Ton, Diatomeenerde, Kunststoffe oder dgl., eingesetzt. Durch Einsatz eines inerten Trägers mit großer, innerer Oberfläche gelingt eine Ausbeuteverbesserung bei dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung von wenigstens 50 % gegenüber herkömmlichen Verfahren, welche ohne inertem Träger mit großer, innerer
20 Oberfläche durchgeführt werden, zu erzielen. Derartige Ausbeutesteigerungen machen das Verfahren nicht nur wirtschaftlicher, sondern stellen auch sicher, daß ausreichende
25 Mengen der gewünschten Endprodukte der isotopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukte hergestellt werden können, um diese sinnvoll in Analysen als interner Standard bzw. auch in metabolischen Studien einsetzen zu können.

30 Die größten Verbesserungen der Ausbeute können gemäß der Erfindung insbesondere dadurch erzielt werden, daß als inerter Träger mit großer, innerer Oberfläche ein Aluminiumsilikat, beispielsweise Diatomeenerde, insbesondere

Kieselgur, Isolute HM-N oder ein Zeolith oder ein Schichtsilikat, insbesondere ein Vermiculit, aus der Gruppe der Glimmerminerale, in natürlicher oder behandelter Form eingesetzt wird. Bei diesen Substanzen ist insbesondere die
5 Oberflächenbeschaffenheit, wie Oberflächenspannung, Porosität und dgl., für einen besonders guten Umsatz an der Trägeroberfläche geeignet. In analoger Weise können durch Verwendung inerter Kunststoffträger, die aus Schaumstoff, Polyamid, Silikon, Polyethylen, Polypropylen, Polytetra-
10 fluorethylen, Polyester oder dgl., gewählt sein können, entsprechende Ausbeuteverbesserungen erzielt werden, wobei der Einsatz von natürlichen Trägern mit großer, innerer Oberfläche bzw. der Einsatz von Kunststoffträgern in Abhängigkeit von den herzustellenden Stoffwechselprodukten in
15 gleicher Weise verbesserte Ausbeuten ergibt.

Für eine möglichst rasche Verfahrensführung bei gleichzeitig hoher Ausbeute ist die Erfindung dahingehend weitergebildet, daß die Herstellung bei Temperaturen zwischen 3
20 und 45 °C, insbesondere zwischen 10 und 35 °C, durchgeführt wird. In diesem Zusammenhang hat es sich teilweise als günstig erwiesen, daß ein Herstellungsverfahren nicht immer bei gleichbleibender Temperatur geführt wird, sondern daß auch Temperaturwechsel innerhalb der angegebenen Grenzen zu
25 Ausbeuteverbesserungen bzw. Beschleunigung der Reaktionen bzw. Umsätze führen können.

Um ein möglichst reines Endprodukt zu erzielen, wird das erfindungsgemäße Verfahren so geführt, daß die isotopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukte aus dem flüssigen,
30 synthetischen Kulturmedium durch Extraktion und Aufkonzentration, beispielsweise durch die Kombination der Schritte, wie Fest/Flüssig-Flüssig/Flüssig-Extraktion, Zentri-

fugieren, Filtration, Eindampfen, Einengen und Verdampfen, gewonnen werden. Nach der Gewinnung der isotopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukte hat es sich als vorteilhaft erwiesen, diese Produkte einer weiteren Reinigung zu unterwerfen, wobei gemäß der Erfindung in bevorzugter Weise als
5 Reinigungsverfahren chromatographische Verfahren, insbesondere Säulenchromatografie, präparative Dünnschichtchromatografie, Ionenchromatografie, Affinitätschromatografie, Ausschußchromatografie und/oder präparative Hochleistungs-
10 Flüssigkeitschromatografie, eingesetzt werden. Nach einem derartigen Aufarbeitungsverfahren und Reinigungsverfahren gelingt es, isotopenmarkierte, sekundäre Stoffwechselprodukte von Pilzen und Bakterien zu erzielen, in welchen wenigstens 95 % der Kohlenstoffatome, Stickstoffatome
15 und/oder Schwefelatome durch die entsprechenden stabilen Isotope ersetzt sind, und somit können Produkte erzielt werden, die eine entsprechende Massendifferenz zum natürlichen Analyten aufweisen, um beispielsweise in einer Flüssigkeitschromatografie mit massenspektrometrischer Detek-
20 tion (LCMS) ausreichend von natürlich auftretenden, schweren Isotopen unterscheidbar zu sein und somit beispielsweise einen stabilen, eindeutig identifizierbaren, internen Standard in derartigen Analysen zur Verfügung stellen können.

25

Die Erfindung zielt weiters auf ein isotopenmarkiertes, sekundäres Stoffwechselprodukt von Pilzen und Bakterien ab, welches im wesentlichen vollständig, insbesondere wenigstens 95 % aller Kohlenstoffatome, Stickstoffatome und/oder
30 Schwefelatome durch stabile Isotope ersetzt aufweist.

Derartige isotopenmarkierte, sekundäre Stoffwechselprodukte von Pilzen oder Bakterien können gemäß einer Weiterbildung

der Erfindung als interne Standards in der Analytik, für Stoffwechselstudien in Fütterungsversuchen bei Tieren, für metabolische Studien, zur Aufklärung von Stoffwechselkreisläufen, Abbauwegen und/oder Abbauzeitspannen sowie Einlagerungen eingesetzt werden. In sämtlichen genannten Einsatzzwecken ist es von wesentlicher Bedeutung, einen stabilen und eindeutig nachweisbaren Standard bzw. eine eindeutig nachweisbare und verfolgbare Substanz in dem Versuchsschema bzw. Abbauschema enthalten zu haben, um die einzelnen Verfahrensschritte eindeutig nachvollziehen zu können.

Gemäß einer Weiterbildung sind in den analytischen Verfahren bzw. den Stoffwechselstudien, Abbauwegen und dgl. als Stoffwechselprodukte Mykotoxine, insbesondere Trichothecene, wie Nivalenol, Deoxynivalenol, 3-Acetyl-Deoxynivalenol, 15-Acetyl-Deoxynivalenol, Fusarenon X, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, DAS, Fumonisine, wie Fumonisin B1, B2 oder B3, Ochratoxine, wie Ochratoxin A, B, C oder D, Zearalenone, Moniliformin oder Aflatoxine, wie Aflatoxin B1, B2 G1 oder G2, eingesetzt. Mykotoxine sind von immer größerer Bedeutung in der Ätiologie von tierischen Krankheiten und es ist notwendig, ausreichende Mengen derartiger Substanzen technisch herzustellen, um mit chemisch möglichst eindeutigen bzw. reinen Stoffen in der Folge entsprechende toxikologische, veterinärmedizinische Untersuchungen durchführen zu können. Da Mykotoxine eine ernsthafte Gesundheitsgefährdung von Tier und Mensch darstellen, ist deren Analytik ein Thema von globalem Interesse, da insbesondere bereits viele Länder Richt- und Grenzwerte für die Toleranz derartiger Substanzen entwickelt haben. Der Nachweis bzw. die Quantifizierung derartiger Mykotoxine über den Einsatz von internen Standards, welche eindeutig nachweisbar sind und somit eine

quantitative Analyse des jeweiligen Toxins ermöglichen, stellt einen bedeutenden Fortschritt beim Nachweis derartiger gefährlicher Substanzen zur Verfügung.

- 5 In gleicher Weise ist auch der quantitative Nachweis bzw. die Verfolgung von Toxinen, insbesondere, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, Endoxinen und Exotoxinen, insbesondere Bakterientoxinen von *Escherichia coli* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., *Bacillus* sp.
- 10 oder *Staphylococcus* sp., von ebenfalls vitalem Interesse für die Volksgesundheit bzw. für den Nachweis von schädlichen Substanzen in Nahrungs- und Genußmitteln. Auch der Einsatz von Stoffwechselprodukten, wie Antibiotika, insbesondere die von Actinomyceten gebildeten Antibiotika, wie
- 15 Tetracycline, Streptomycine oder Aminoglycoside, von *Bacillus* sp. gebildete Antibiotika, wie Bacitracin oder Polymyxin, von *Penicillium* gebildete Antibiotika, wie Penicillin oder Griseofulvin, oder von *Cephalosporium* gebildete Cephalosporine, hat immer größere Bedeutung, insbesondere im
- 20 Fall von Erkrankungen bzw. im Fall eines Nachweises derartiger Substanzen in Nahrungs- und Genußmitteln, wobei auch für diese Substanzen festzuhalten ist, daß Substanzen, mit welchen ein quantitativer Nachweis der Stoffwechselprodukte, wie Antibiotika, gelingt, von vitalem Interesse für
- 25 die Allgemeinheit sind.

Gemäß einer Weiterbildung gelangen als Stoffwechselprodukte Reinsubstanzen mit einem Durchmarkierungsgrad mit ^{13}C , ^{15}N bzw. ^{33}S oder ^{34}S zur Anwendung, wodurch einerseits eine

30 eindeutige Unterscheidung von den nicht markierten Substanzen bzw. Stoffwechselprodukten möglich ist und andererseits auch eine Unterscheidung von natürlich vorkommenden Isotopen mit Sicherheit gewährleistet wird und schließlich in

Analysen bzw. Nachweisverfahren eine eindeutig verfolgbare Substanz zur Verfügung gestellt werden kann.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher
5 erläutert, welche die Herstellung von hochgradig isotopenmarkierten Stoffwechselprodukten zeigen.

Beispiel 1

Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem [U-¹³C₁₅]-
10 Deoxynivalenol (DON)

Zur Herstellung von vollständig durchmarkiertem ¹³C-DON wird ein Fusarium-Pilz, nämlich Fusarium graminearum, auf inertem Trägermaterial, nämlich Vermiculit, inokuliert und
15 in einem synthetischem Kulturmedium, bestehend aus 0,5 g K₂HPO₄, 2,0 g NaNO₃, 0,7 g MgSO₄·7H₂O, 2,0 g KCl, 15 g D-[U-¹³C₆]Glucose, 1,5 g NH₄H₂PO₄, 15 mg Fe(II)SO₄·7H₂O oder 20 mg ZnSO₄·7H₂O, das D-[U-¹³C₆]Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle enthält, bebrütet. Nach 5 Wochen bei ca. 28 °C wird
20 das toxinhaltige Material mit Ethylacetat extrahiert und anschließend zur Standardqualität (Reinheit > 98 %) mittels Extraktion, Chromatografie und Kristallisation aufgereinigt.

25 Pro Produktionsansatz werden ca. 40 ml Inkubationsansatz bereitet. Gepooltes, toxinhaltiges Material wird anschließend weiterverarbeitet. Aus 1000 ml Ansatz werden zwischen 5 und 50 mg [7.5 bis 17.5mg] vollständig durchmarkiertes [U-¹³C₁₅]-DON gewonnen.

30

Das gereinigte Produkt wurde mittels folgender Analyseverfahren charakterisiert:

¹H NMR u. ¹³C-NMR

LC-MS/MS Q Trap zur Bestimmung des ^{13}C Isotopenanteils
Reinheits- und Konzentrationsbestimmung gegen Referenzmate-
rialien mit UV/VIS und HPLC-DAD
Justierung der Konzentration

5

Qualitätskontrolle mit UV/VIS, HPLC-DAD, LC-MS/MS Q Trap
Ein derartiges hochgradig isotopenmarkiertes $^{13}\text{C}_{15}$ -
Deoxynivalenol ($^{13}\text{C}_{15}$ -DON) kann beispielsweise als interner
Standard eingesetzt werden. Ein derartiger interner Stan-
10 dard hat eine exakt um 15 g/Mol schwerere Molmasse und so-
mit erscheint sein Signal im Massenspektrum (Fig. 1) genau
15 amu höher als das Signal des Analyten. Da sämtliche son-
stigen chemischen und physikalischen Eigenschaften des ^{13}C -
markierten DON ident mit dem Analyten sind, geht ein der-
artiger interner Standard exakt dieselbe Fragmentierung wie
der Analyt ein, auch die Ionisierung der Substanz ist
gleich und somit auch die Ionisierungsausbeute. Dies bedeu-
tet, daß die Signalthöhe der Fragmente bzw. Substanzen
zwischen internem Standard und Analyten absolut vergleich-
20 bar wird und, da die Konzentration des internen Standards
in einer Analyse bekannt ist, können dadurch direkte Rück-
schlüsse auf die Konzentration eines Analyten gezogen wer-
den, wodurch ein derartig hochgradig durchmarkiertes Deoxy-
nivalenol einen nahezu idealen internen Standard darstellt.

25

Fig. 1 zeigt C_{12} -DON und C_{13} -DON in einem gemeinsamen
Massenspektrum. In Fig. 1 ist neben den Molekülpeaks von
 $^{13}\text{C}_{15}$ -DON und jenem von ^{12}C -DON bei 295,2 bzw. 310,2 auch die
Verteilung der Verbindungen, bei denen nicht alle C-Atome
30 durchmarkiert wurden und somit nicht aus einer Isotopen-
sorte bestehen (Isotopomere), gezeigt. Im Fall des natür-
lich vorkommenden Deoxynivalenols ist dies das $^{13}\text{C}_1$ -DON, was
der natürlichen Verteilung zwischen C_{12} und C_{13} entspricht.

Beispiel 2Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem ^{13}C -Fumonisin

5 Zur Herstellung eines vollständig mit ^{13}C markierten Fumonisins werden 1000 ml Flüssigmedium, bestehend aus 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g KNO_3 , 0,7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g KCl , 17,5 g D- $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$, 1,5 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 15 mg $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 20 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, mit D- $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ als einziger Kohlenstoffquelle, aufgebracht auf 1 x 1 x 1 cm große Schaumstoffwürfel, mit *Fusarium moniliforme* inokuliert und bei 28 °C und 70 % relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank bebrütet. Nach 3 Wochen wird das toxinhaltige Material mit einem Lösungsmittelgemisch aus 1:1 Acetonitril: H_2O extrahiert und anschließend zur Standardqualität (Reinheit > 98 %) mittels Extraktion und Chromatografieschritte, wie Ionentauscherchromatografie, Flash-Säulenchromatografie mit Kieselgel, Dünnschichtchromatografie und präparative HPLC, aufgereinigt.

20

Pro 1000 ml Ansatz werden so 80 - 240 mg an ^{13}C -Fumonisin gewonnen (HPLC-FLD).

Beispiel 3

25 Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem $[\text{U}-^{13}\text{C}_{17}]\text{-3-Acetyl-Deoxynivalenol}$

Zur Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem $[\text{U}-^{13}\text{C}_{17}]\text{-3-Acetyl-Deoxynivalenol}$ werden 1000 ml synthetisches Flüssigmedium, bestehend aus 0,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g KNO_3 , 0,7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g KCl , 17,5 g D- $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$, 1,5 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 15 mg $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 20 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, das vollständig isotopenmarkierte $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{-Glucose}$ als alleinige

Kohlenstoffquelle enthält, aufgebracht auf eine Diatomeenerde, nämlich Isolute HM-N, mit *Fusarium graminearum* inokuliert und bei 28 °C für 9 Tage im Brutschrank bebrütet. Nach 9 Tagen wird das toxinhaltige Material geerntet, mit
5 Acetonitril/H₂O-Acetotrop extrahiert und anschließend zur Standardqualität (Reinheit > 98 %) mittels Extraktion, Chromatografie, Kristallisation, Büchi-MPLC und Umkristallisieren aufgereinigt. Aus einem Ansatz können ca. 15 - 50 mg hochreines Endprodukt gewonnen werden. Die Kontrolle der
10 Reinheit erfolgte durch LC-UV Analyse mit einer C18-Kapillarsäule.

Ein derartiges hergestelltes, isotopenmarkiertes 3-Acetyl-Deoxynivalenol hat eine gegenüber dem nicht durchmarkierten
15 3-Acetyl-Deoxynivalenol um 17 g/Mol schwerere Molekülmasse. Nicht durchmarkiertes 3-Acetyl-Deoxynivalenol hat eine Molekülmasse von $M/z = 338$ und das vollständig isotopenmarkierte Produkt hat eine Molekülmasse von 355. Fig. 2 zeigt das Massenspektrum des reinen ¹³C-3-Acetyl-Deoxynivalenol,
20 bei welchem zu erkennen ist, daß eine Durchmarkierung des Produkts zu 75 % gelungen ist und die Isotopenverteilung des Produkts erkennbar ist. Die Verteilung des Produkts und der nicht vollständig durchmarkierten Isotopomere ist in diesem Fall von der Isotopenreinheit des Ausgangsprodukts
25 ¹³C₆-Glukose abhängig und kann bei Einsatz von vollständig reiner ¹³C₆-Glukose noch deutlich in Richtung vollständig durchmarkiertes Produkt verschoben werden. Aus Fig. 2 ist jedoch deutlich zu erkennen, daß Isotopomere, die weniger als 13 ¹³C-Atome besitzen, bereits so gut wie nicht vorhanden
30 sind, so daß auch das ¹³C-3-Acetyl-Deoxynivalenol sehr gut als interner Standard eingesetzt werden kann.

Beispiel 4Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem [U-¹³C₁₇]-15-Acetyl-Deoxynivalenol

- 5 Zur Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem [U-¹³C₁₇]-15-Acetyl-Deoxynivalenol wird Kulturmedium, bestehend aus 0,5 g K₂HPO₄, 2,0 g NaNO₃, 0,7 g MgSO₄*7H₂O, 2,0 g KCl, 15 g D-[U-¹³C₆]Glucose, 1,5 g NH₄H₂PO₄, 15 mg Fe(II)SO₄*7H₂O und 20 mg ZnSO₄*7H₂O, auf grobkörnigem Phyllosilikatträger mit
- 10 Fusarium graminearum inokuliert und im Brutschrank bei 28 °C bebrütet. Nach 9 Tagen wird das toxinhaltige Material geerntet, mit Ethylacetat extrahiert und anschließend zur Standardqualität (Reinheit > 98 %) mittels Extraktion, Chromatografie und Kristallisation aufgereinigt. Alternativ
- 15 zur Kristallisation kann auch ein weiterer Reinigungsschritt mittels präparativer HPLC eingesetzt werden.

Aus einem Fermentationsansatz können ca. 30 - 60 mg hochreines Zielprodukt gewonnen werden.

20

Beispiel 5Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem [U-¹³C₁₅]-Nivalenol oder [U-¹³C₁₇] Fusarenon X

- 25 Zur Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem [U-¹³C₁₅]-Nivalenol oder [U-¹³C₁₇] Fusarenon X wird ein Flüssigmedium, bestehend aus 0,5 g K₂HPO₄, 2,0 g NaNO₃, 0,7 g MgSO₄*7H₂O, 2,0 g KCl, 15 g D-[U-¹³C₆]Glucose, 1,5 g NH₄H₂PO₄, 15 mg Fe(II)SO₄*7H₂O oder 20 mg ZnSO₄*7H₂O, mit [U-¹³C₆]-Glucose
- 30 als einziger Kohlenstoffquelle und inertes Phyllosilikat mit Fusarium nivale inokuliert und bei 28 °C für 5 Wochen bebrütet. Dann wird das toxinhaltige Material mit Methanol und Methylenchlorid extrahiert und anschließend zur Stan-

dardqualität (Reinheit > 98 %) mittels Extraktion, Chromatografie und Kristallisation aufgereinigt. Alternativ zur Kristallisation kann auch ein weiterer Reinigungsschritt mittels präparativer HPLC eingesetzt werden.

5

Beispiel 6

Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem [U-¹³C₂₀]-Ochratoxin A

- 10 Zur Gewinnung der Zielsubstanz wird der Pilz *Petromyces albertensis* auf einem inertem Phyllosilikatträger mit synthetischem Flüssigmedium, bestehend aus 0,5 g K₂HPO₄, 2,0 g NaNO₃, 0,7 g MgSO₄*7H₂O, 2,0 g KCl, 15 g D-[U-¹³C₆]Glucose, 1,5 g NH₄H₂PO₄, 15 mg Fe(II)SO₄*7H₂O oder 20 mg ZnSO₄*7H₂O,
- 15 das als einzige Kohlenstoffquelle vollständig ¹³C-markierte Glucose enthält, fermentiert. Die Kolben werden in der Folge in einem Brutschrank 6 Wochen bei 28 °C und 70 % Luftfeuchte inkubiert und danach mit Toluol extrahiert. Die Zielsubstanz wird wie in den vorherigen Beispielen säu-
- 20 lenchromatographisch aufgereinigt und umkristallisiert.

Beispiel 7

Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem [U-¹³C₁₈]-Zearalenon

25

- Zur Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem [U-¹³C₁₈]-Zearalenon werden 1000 ml Flüssigmedium, bestehend aus 0,5 g KH₂PO₄, 0,5 g KNO₃, 0,7 g MgSO₄*7H₂O, 2,0 g KCl, 17,5 g D-[U-¹³C₆]Glucose, 1,5 g NH₄H₂PO₄, 15 mg Fe(II)SO₄*7H₂O und 20
- 30 mg ZnSO₄*7H₂O, mit D-[U-¹³C₆]Glucose als einziger Kohlenstoffquelle, aufgebracht auf porösem, gebranntem Ton in Granulatform, nämlich Seramis oder Lecca, mit *Fusarium semitectum* inokuliert und bei 28 °C und 70 % relativer Luft-

feuchtigkeit im Brutschrank bebrütet. Nach 3 Wochen wird das toxinhaltige Material mit reinem Petrolether und Petrolether/Ethylacetat-Gemisch von 4:1 und 2:1 extrahiert und anschließend zur Standardqualität (Reinheit > 98 %) mittels Extraktion und Chromatografieschritten, wie Ionentauscherchromatografie, Flash-Säulenchromatografie mit Kieselgel, Dünnschichtchromatografie und präparativer HPLC, aufgereinigt.

10 Beispiel 8

Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem $^{15}\text{N}_5$ -Rocquefortine C

Zur Herstellung eines vollständig mit dem Stickstoffisotop ^{15}N markierten Rocquefortin C werden 1000 mL Flüssigmedium, bestehend aus 0,8 g KH_2PO_4 , 0,7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g KCl , 17,5 g D-Glucose, 1,0 g $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, 1,5 g NaH_2PO_4 , 15 mg $\text{Fe(II)SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, mit $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ als einziger Stickstoffquelle, aufgebracht auf groben Kieselgur, mit *Penicillium commune* inokuliert und bei 12 °C und 70 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank bebrütet. Nach 48 Tagen wird das toxinhaltige Material mit einem organischen Lösungsmittelgemisch, bestehend aus 9:1 Chloroform:Methanol extrahiert und anschließend zur Standardqualität (Reinheit > 98 %) mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion, Flash-Säulenchromatographie mit Kieselgel und präparativer HPLC, aufgereinigt. Pro 1000 mL Ansatz werden 300 mg an $^{15}\text{N}_5$ -Rocquefortine C gewonnen (HPLC-FLD).

Beispiel 9Herstellung von hochgradig isotopenmarkiertem $^{15}\text{N}_2$ - ^{33}S -Penicillin

- 5 Zur Herstellung eines vollständig mit dem Stickstoffisotop ^{15}N und dem Schwefelisotop ^{33}S markierten Penicillin werden 1000 mL Flüssigmedium, bestehend aus 1,0 g K_2HPO_4 , 0,2 g MgCl_2 , 20,0 g D-Glucose, 1,0 g $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$, 0,5 g $\text{Na}_2^{33}\text{SO}_4$, 1,5 g Na_2HPO_4 , 5 mg Fe(II)Cl_2 , 5 mg ZnCl_2 , mit $^{15}\text{NH}_4^{15}\text{NO}_3$ als ein-
- 10 ziger Stickstoffquelle und $\text{Na}_2^{33}\text{SO}_4$ als einzige Schwefelquelle, aufgebracht auf kleinen Schaumstoffwürfeln, mit Penicillium notatum inokuliert und bei 28 °C und 70 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank bebrütet. Nach 30 Tagen wird das toxinhaltige Material mit Ethylacetat extrahiert und
- 15 anschließend zur Standardqualität (Reinheit > 98 %) mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion, Flash-Säulenchromatographie mit Kieselgel und präparativer HPLC, aufgereinigt. Pro 1000 mL Ansatz werden 500 mg an $^{15}\text{N}_2$ - ^{33}S -Penicillin gewonnen (HPLC-FLD).

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung von isotopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukten von Pilzen oder Bakterien in
5 einem flüssigen, synthetischen Kulturmedium, dadurch gekennzeichnet, daß die Synthese durch Immobilisieren der Pilze oder Bakterien auf einem inerten Träger unter Zugabe von flüssigem, synthetischem Kulturmedium, in welchem im wesentlichen sämtliche Kohlenstoffatome, Stickstoffatome
10 und/oder Schwefelatome durch stabile Isotope ersetzt wurden, durchgeführt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Kohlenstoffquelle im flüssigen, synthetischen Kulturmedium Zucker oder Zuckeralkohole, insbesondere D-[U-¹³C₆]-
15 Glucose, ¹³C-Saccharose, ¹³C-Glycerin und/oder ¹³C-Acetat, als Stickstoffquellen ¹⁵N-Aminosäuren, -Nitrate, -Ammoniumverbindungen oder -Harnstoff, als Schwefelquellen ³³S- oder ³⁴S-Sulfate, -Sulfide oder -Aminosäuren eingesetzt
20 sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das flüssige, synthetische Kulturmedium zusätzlich eine Mischung, gewählt aus anorganischen Salzen oder Säuren
25 und Basen mit den Ionen Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, B⁺⁺⁺ sowie CO₃⁻⁻, SO₄⁻⁻, PO₄⁻⁻⁻, NO₃⁻, enthält.

4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß als inerter Träger ein natürlicher oder synthetischer Träger mit großer innerer Oberfläche, insbesondere Silikat, Schichtsilikat, Zeolith, Bentonit, gebrannter
30 Ton, Diatomeenerde, Kunststoffe oder dgl., eingesetzt werden.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als inerter Träger ein Aluminiumsilikat, beispielsweise ein Zeolith oder ein Schichtsilikat, insbesondere ein Vermiculit, aus der Gruppe der Glimmerminerale, in natürlicher oder behandelter Form eingesetzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als inerter Kunststoffträger Schaumstoff, Polyamid, Silikon, Polyethylen, Polypropylen, Polytetrafluorethylen, Polyester oder dgl. eingesetzt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Herstellung bei Temperaturen zwischen 3 und 45 °C, insbesondere zwischen 10 und 35 °C, durchgeführt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die isotopenmarkierten, sekundären Stoffwechselprodukte aus dem flüssigen, synthetischen Kulturmedium durch Extraktion und Aufkonzentration, beispielsweise durch die Kombination der Schritte, wie Fest/Flüssig-Flüssig/Flüssig-Extraktion, Zentrifugieren, Filtration, Eindampfen, Einengen und Verdampfen, gewonnen werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Reinigungsverfahren chromatographische Verfahren, insbesondere Säulenchromatografie, präparative Dünnschichtchromatografie, Ionenchromatografie, Affinitätschromatografie, Ausschlußchromatografie und/oder präparative Hochleistungs-Flüssigkeitschromatografie, eingesetzt werden.

10. Isotopenmarkiertes, sekundäres Stoffwechselprodukt von Pilzen oder Bakterien, welches gemäß einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 hergestellt ist, zur Herstellung eines internen Standards in der Analytik, für Stoffwechselstudien in Fütterungsversuchen bei Tieren, für metabolische Studien, zur Aufklärung von Stoffwechselkreisläufen, Abbauwegen und/oder Abbauzeitspannen sowie Einlagerungen.
- 10 11. Stoffwechselprodukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Stoffwechselprodukt Mykotoxine, insbesondere Trichothecene, wie Nivalenol, Deoxynivalenol, 3-Acetyl-Deoxynivalenol, 15-Acetyl-Deoxynivalenol, Fusarenon X, T-2 Toxin, HT-2 Toxin, DAS, Fumonisine, wie Fumonisin B1, 15 B2 oder B3, Ochratoxine, wie Ochratoxin A, B, C oder D, Zearalenone, Moniliformin oder Aflatoxine, wie Aflatoxin B1, B2 G1 oder G2, eingesetzt sind.
- 20 12. Stoffwechselprodukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Stoffwechselprodukt Toxine, wie Endoxine und Exotoxine, insbesondere Bakterientoxine von *Escherichia coli* sp., *Salmonella* sp., *Clostridium* sp., *Bacillus* sp. oder *Staphylococcus* sp., eingesetzt sind.
- 25 13. Stoffwechselprodukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß als Stoffwechselprodukt Antibiotika, insbesondere die von Actinomyceten gebildeten Antibiotika, wie Tetracycline, Streptomycine oder Aminoglycoside, von *Bacillus* sp. gebildete Antibiotika, wie Bacitracin oder 30 Polymyxin, von *Penicillium* gebildete Antibiotika, wie Penicillin oder Griseofulvin, oder von *Cephalosporium* gebildete Cephalosporine eingesetzt sind.

14. Stoffwechselprodukt nach einem der Ansprüche 10 bis 13, als Reinsubstanz mit einem Durchmarkierungsgrad mit ^{13}C , ^{15}N , ^{33}S oder ^{34}S von wenigstens 95 %.

1/2

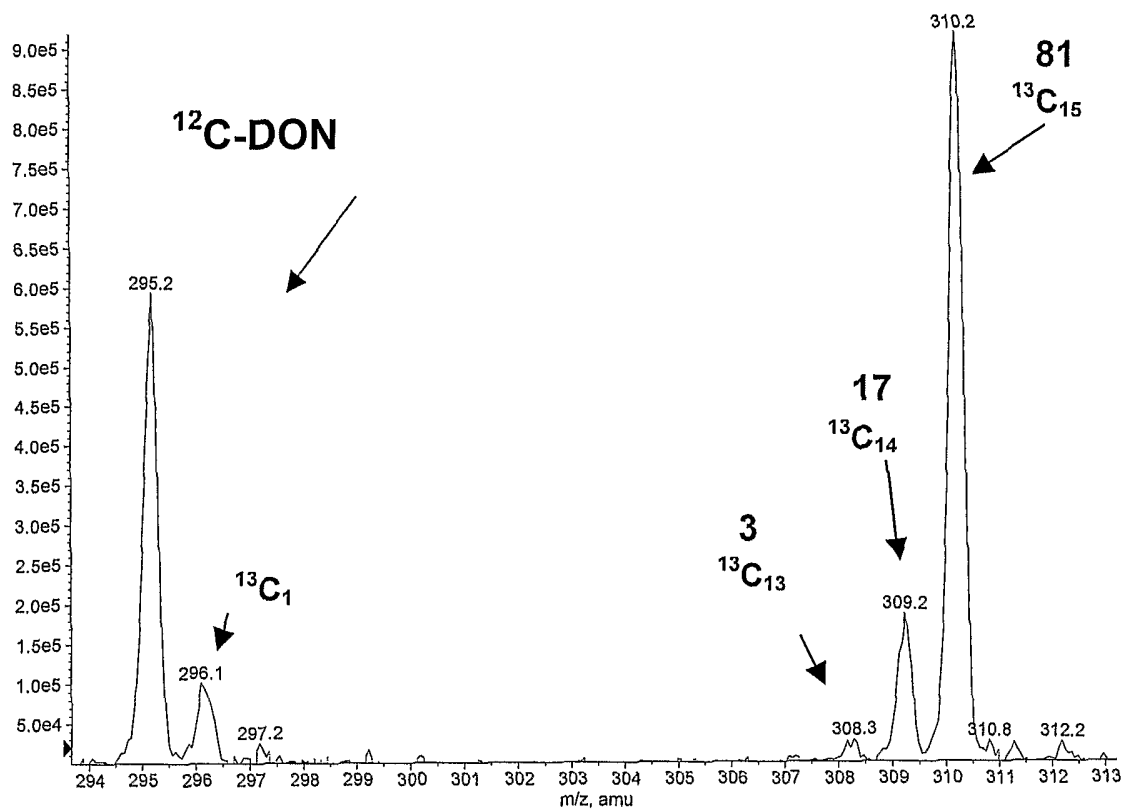


Fig. 1

2/2

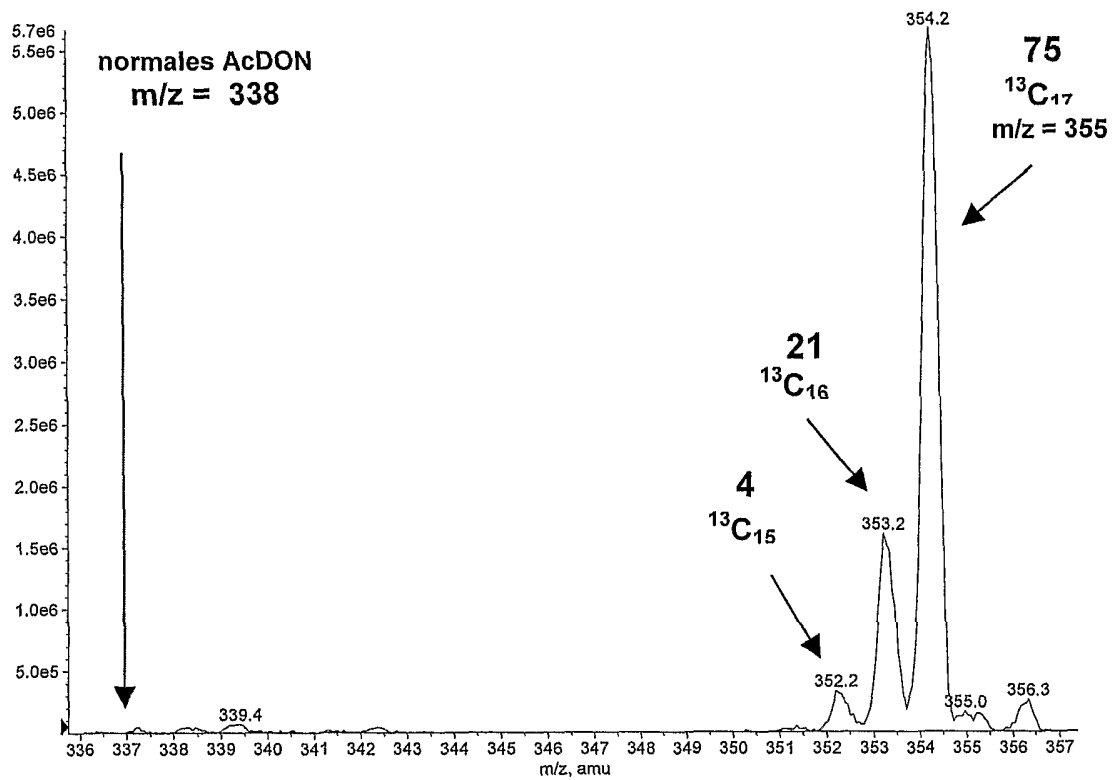


Fig. 2